

ANA PAULA AZAMBUJA

**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA STI1, UM LIGANTE DA
PROTEÍNA PRION CELULAR, EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS**

**Monografia apresentada para a obtenção do
Título de Bacharel em Ciências Biológicas, no
Curso de Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Wanderer

Co-orientador: Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata

CURITIBA

2004

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos por toda a força e carinho, pelo incentivo incontestável e pelo gosto pelo estudo, sem os quais seria impossível a elaboração deste trabalho.

Ao meu amor, Rodrigo Makowiecky Stuart, cuja inteligência, carinho, compreensão e ajuda estiveram presentes em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

À Carla Wanderer, amiga e orientadora, que sempre apoiou e incentivou o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À professora Cloris Ditzel Faraco e toda a equipe de seu laboratório pela ajuda e apoio que foram indispensáveis à elaboração deste trabalho.

Ao co-orientador, professor Sílvio Marques Zanata, pelo crédito e confiança depositados em todo o decorrer do projeto.

Aos meus amigos que com muita alegria e companheirismo tornaram mais descontraído todo este importante período.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a continuidade e elaboração deste trabalho.

“O que distingue um cientista de um não-cientista é o fato de que o primeiro confessa imediatamente a própria ignorância. De fato, só à base dela é que surge seu desejo de conhecer. Se soubesse tudo não se colocaria nenhuma pergunta, não daria início a pesquisa nenhuma.”

Heinz von Foerster

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. STI1.....	01
1.2. PRION.....	03
2. OBJETIVO.....	07
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	08
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	08
3.1.1. Fase Piloto.....	08
3.1.2. Fase Experimental.....	09
3.2. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	10
3.2.1. Obtenção dos Embriões.....	10
3.2.2. Anticorpos.....	11
3.2.3. Processamento Imunohistoquímico dos Embriões.....	11
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	12
3.3.1. Inclusão em <i>Paraplast</i>	12
3.3.2. Protocolo de Incubação dos Embriões.....	12
4. RESULTADOS.....	13
4.1. CORTES TRANSVERSAIS DAS REGIÕES TORÁCICA E SACRAL.....	14
4.2. CORTES TRANSVERSAIS E CORONAIS DA REGIÃO CEFÁLICA.....	16
4.3. CORTES SAGITAIS.....	18
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÕES.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – ESQUEMA DE CORTES TRANSVERSAIS, CORONAL E SAGITAL EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS (13 DIAS).....	09
FIGURA 02 – EMBRIÃO DE CAMUNDONGO AOS 13 DIAS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	10
FIGURA 03 – CORTES TRANSVERSAIS DO TUBO NEURAL.....	15
FIGURA 04 – CORTES TRANSVERSAIS DA REGIÃO TORÁCICA.....	15
FIGURA 05 – CORTES TRANSVERSAIS DO DIENCÉFALO.....	16
FIGURA 06 – CORTE TRANSVERSAL DO OLHO.....	17
FIGURA 07 – CORTES CORONAIS DA REGIÃO CEFÁLICA.....	17
FIGURA 08 – CORTES SAGITAIS DO CORAÇÃO.....	18
FIGURA 09 – CORTES SAGITAIS DE PULMÃO.....	19
FIGURA 10 – CORTES DE MOLDES DE CARTILAGEM.....	19
FIGURA 11 – CORTE SAGITAL DO PLEXO CORÓIDE.....	20
FIGURA 12 – CORTE SAGITAL DE DUCTO E TÚBULOS MESONÉFRICOS.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – *Bovine Serum Albumin*, albumina bovina

BSE – Encefalopatia espongiforme bovina

CDJ – Doença de Creutzfeldt-Jakob

DAB – Diaminobenzidina

FITC – Isotiocianato de fluorescência

GPI – Âncora glicosilfosfatidilinositol

Hsp – *Heat shock protein*

PBS – Solução salina tamponada

PrPc – Proteína prion celular

PrPsc – Proteína prion *scrapie*

PrR – Peptídeo complementar ao prion

SOD – Enzima superóxido dismutase

STI1 – *Stress-inducible protein 1*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a distribuição da proteína STI1, um ligante da proteína prion celular, através de imunohistoquímica, em embriões de camundongos com treze dias de desenvolvimento embrionário. STI1, uma proteína de choque térmico, apresenta grande homologia, de leveduras a camundongos e humanos, tendo distribuição intracelular complexa. Como o enfoque dado a proteína é recente, sua função exata ainda não foi elucidada, havendo citações de participação na extensão de pseudópodos; na mediação da resposta ao choque térmico; na estruturação de complexos com as chaperoninas moleculares Hsp70 e Hsp90; e ainda, como receptor, mediador da internalização do prion celular, proteína envolvida no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Para o desenvolvimento deste trabalho, foram feitos acasalamentos entre camundongos, sendo, após treze dias, feita a coleta dos embriões, que foram dissecados de seus anexos embrionários, fixados em paraformaldeído 4%, seccionados transversalmente e sagitalmente, e incluídos em *Paraplast*. Em micrótomo foram obtidos cortes (5µm) transversais da região cefálica, torácica e sacral, coronais da região cefálica e sagitais do embrião inteiro. Os cortes foram submetidos ao protocolo de imunohistoquímica, com a utilização de anticorpo secundário complexado com Peroxidase, sendo a análise deste material feita em microscopia óptica. A distribuição encontrada foi bastante ampla, podendo-se encontrar células STI1 positivas em cartilagens (condrócitos maduros), mesênquima, epitélios de revestimento respiratório e do intestino, ductos e túbulos mesonéfricos, coração, nervos periféricos, zona intermediária e marginal (substância branca) do tubo neural do tronco e região sacral dos embriões, e zona cortical do tubo neural da região cefálica. Esta distribuição de STI1 em todos os tipos celulares condiz com o esperado, visto esta proteína pertencer ao grupo das proteínas de choque térmico, atualmente consideradas como de manutenção de atividades celulares (*housekeeping*). Estes dados refletem ainda um padrão de distribuição dependente da diferenciação celular, uma vez que células indiferenciadas (zona ventricular do tubo neural e pericôndrio, por exemplo) não apresentaram marcação. Observou-se coincidência de sítios de localização de STI1, encontrados neste trabalho, com a localização descrita para a proteína prion celular, corroborando com a idéia de interação entre estas proteínas.

Palavras-chave: STI1, embrião de camundongo, proteína prion celular, imunohistoquímica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. STI1

A exposição de células eucarióticas e procarióticas à temperatura elevada ou outro estresse ambiental resulta na ativação de uma pequena, mas altamente conservada família de genes que codificam as proteínas de choque térmico (KRONE et al., 2003). Além da expressão, o fenômeno de estresse celular também pode se manifestar afetando a localização e a modificação pós-traducional desse grupo de proteínas (LÄSSLE et al., 1997).

Uma dessas proteínas de choque térmico, a proteína STI1 (stress inducible protein 1), também designada extendina, devido a sua participação na extensão de pseudópodos (BLATCH et al., 1997), foi primeiramente descrita na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde está envolvida na mediação da resposta ao choque térmico de certos genes HSP70 (NICOLET; CRAIG, 1989). A proteína STI1 de leveduras apresenta uma identidade de aminoácidos de 42% com as suas cognatas de camundongos e humanos (LÄSSLE et al., 1997). O padrão de localização intracelular desta proteína tem se mostrado bastante complexo, sendo a homóloga humana encontrada, por HONORÉ e seus colaboradores (1992), no complexo de Golgi, em pequenas vesículas oriundas deste e ainda no nucléolo de fibroblastos transformados SV40; enquanto que por LÄSSLE e colaboradores (1997), para a homóloga murina, foi destacada uma localização citoplasmática. LÄSSLE e colaboradores (1997) também identificaram, uma seqüência na molécula de STI1 que corresponde a um sinal de localização nuclear, o que levou este grupo a propor que esta proteína poderia ter a capacidade de transitar entre o núcleo e o citoplasma. MARTINS e seus colaboradores (1997) demonstraram ainda que apesar de o STI1 ser encontrado principalmente no citoplasma, uma pequena fração da proteína total (~6%) é encontrada na membrana celular. A presença de STI1 na superfície celular foi confirmada por ZANATA e colaboradores (2002), apesar da ausência de um domínio transmembrana ou de um peptídeo-sinal de transporte através da membrana, levando à sugestão de que a molécula de STI1 é transportada para a membrana celular em associação com outras proteínas de

membrana, o que seria consistente com a detecção da proteína tanto no complexo de Golgi quanto em pequenas vesículas.

A função exata do STI1 ainda não foi elucidada, no entanto, tem sido proposto que a proteína teria um papel importante na regulação gênica (HONORÉ et al., 1992). Pesquisas têm demonstrado ainda que proteínas STI1 de diversas espécies formam complexos com as proteínas de estresse Hsp70 e Hsp90 (SCHUMACHER et al., 1994; LÄSSLE et al., 1997; VAN DER SPUY et al., 2000; VAN DER SPUY et al., 2001).

As proteínas Hsp70 e Hsp90, primeiramente descritas como proteínas de choque térmico, atuam como chaperones moleculares *in vivo*, reconhecendo e estabilizando intermediários durante o dobramento, montagem e desmontagem de proteínas (SCHUMACHER et al., 1994). A proteína Hsp70 além de se ligar a polipeptídeos recém sintetizados no citoplasma, e a proteínas desnaturadas *in vitro* (SCHUMACHER et al., 1994), também atua, através da hidrólise de ATP, na remoção da cobertura de vesículas recobertas por clatrina (GAO et al., 1991; DE LUCA-FLAHERTY, et al., 1990). Por outro lado, a proteína Hsp90 é possivelmente a proteína, constitutivamente expressada, mais abundante no citoplasma de eucariotos. A interação mais estudada do Hsp90 é com o receptor inativo de hormônios esteróides. Esta e outras associações de Hsp90 aparentam ter como principal característica a estabilização de proteínas marcadas em um estado inativo, parcialmente dobradas, ou desmontadas (SCHUMACHER et al., 1994).

A abundância do complexo STI1-Hsp70-Hsp90, conservado de leveduras a vertebrados, leva à sugestão de que estas três proteínas atuam interativamente em um contexto celular ainda não muito bem definido (SMITH et al., 1993). Em experimentos com reticulócitos de coelho, onde se buscava compreender a renaturação de proteínas mediada por chaperoninas, SCHUMACHER e colaboradores (1994) encontraram grandes quantidades de um complexo formado pelas proteínas de choque térmico Hsp70, Hsp90 e STI1 atuando cooperativamente na atividade de chaperonina dependente de ATP. Este trabalho demonstra ainda que, neste complexo a proteína STI1 não possui atividade como chaperonina significativa, sendo este papel desenvolvido por Hsp70 e Hsp90.

Usando peptídeos representativos de diferentes regiões da molécula de STI1 de camundongos, LÄSSLE e seus colaboradores (1997) reconheceram diferentes sítios de ligação desta proteína com Hsp70 e Hsp90. Neste trabalho demonstrou-se que a proteína de choque térmico Hsp70 somente se liga à região N-terminal de STI1, enquanto que na região C-terminal há apenas a ligação de Hsp90. Esta interação STI1–Hsp70 e STI1–Hsp90 permite a associação íntima entre Hsp70 e Hsp90, sendo mediada por módulos de interação proteína–proteína constituídos de motivos repetidos de tetratricopeptídeos (TRP)(VAN DER SPUIY et al., 2001), os quais acredita-se serem importantes na formação de complexos macromoleculares (LÄSSLE et al., 1997). É possível que este complexo possa participar no transporte de uma série de proteínas através do citoplasma, ou, como já mencionado anteriormente, atuar como um complexo chaperonina.

Tem se tornado cada vez mais claro que as proteínas de choque térmico, quando estudadas no contexto de um organismo multicelular intacto, apresentam papéis muito além daqueles normalmente pensados para proteínas constitutivas de manutenção. Estas proteínas têm se mostrado atuantes críticos no desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e morte de indivíduos (KRONE et al. 2003), sendo que, para o estudo destas proteínas não há nenhum outro momento em um organismo multicelular, em que as suas funções, únicas e críticas, sejam tão aparentes quanto no desenvolvimento embrionário, uma vez que este é um momento em que as células estão continuamente mudando suas características fenotípicas e diferenciando.

1.2. PRION

As encefalopatias espongiformes caracterizam-se como um grupo de doenças fatais, infecciosas e neurodegenerativas. Incluem a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e, no homem, a Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) e a Síndrome de Gerstmann-Sträussler (SHYNG et al., 1993; PRUSINER, 1998; WEISSMANN et al., 2001). Tais doenças estão relacionadas à proteína prion celular (PrPc), uma proteína ligada a uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), abundantemente expressa no Sistema Nervoso Central – SNC (LEE et al., 2001) e em muitos tecidos periféricos

desde o início do desenvolvimento embrionário (SHYNG et al., 1993), e cuja função permanece sob debate.

Reconhece-se atualmente três formas de doenças causadas por prions, referindo-se à aquisição destas: as formas infecciosas, as formas genéticas e as formas esporádicas (GLATZEL & AGUZZI, 2000; CHIARINI et al., 2002). Os três modelos envolvem a mudança conformacional pós-traducional de regiões α -hélice do prion celular em estruturas folha- β , definindo-se assim a forma alterada, protease resistente e insolúvel em detergente (GLATZEL & AGUZZI, 2000), reconhecida como agente causador e infeccioso, de todas as doenças causadas por prions – PrPsc – a qual é acumulada no cérebro dos organismos afetados (GILCH & SCHÄTZL, 2003). As formas infecciosas são atribuídas à entrada no cérebro normal de partículas proteináceas que levam à deposição da forma alterada da proteína (PrPsc). As formas genéticas, por sua vez, são determinadas pelo acúmulo de mutações no gene do PrPc. Em contrapartida, a maioria dos casos dessas doenças são formas esporádicas, onde não é identificada uma infecção prévia e não são reconhecidas mutações em células germinativas, acreditando-se, portanto que a sua ocorrência seja devida à conversão estocástica do PrPc em sua forma anormal (PRUSINER, 1998; LEE et al., 2001). Conclui-se, com isso, que a infecção é dependente da expressão, no organismo hospedeiro, da proteína prion celular normal PrPc, o que é confirmado por experimentos que mostram que camundongos *knockout* (*Prnp*^{0/0}) são resistentes à infecção por prions (BÜELER et al., 1993; BRANDNER et al., 1996).

Uma série de funções tem sido atribuída ao prion normal, sendo que a sua importância em processos fisiológicos é corroborada pela sua marcante conservação entre espécies (MARTINS & BRENTANI, 2002). Dentre tais funções destacam-se a possibilidade do PrPc ligar íons Cu^{2+} , possuir atividade semelhante a enzima superóxido dismutase (SOD), ligar proteínas da matriz extracelular, estando assim envolvida com processos de adesão e diferenciação celulares (revisado por MARTINS & BRENTANI, 2002).

GRANER (2000) e colaboradores demonstraram que o PrPc é um receptor para a laminina, sendo esta interação importante na adesão e diferenciação do neurônio. Trabalhos recentes têm mostrado também a atuação da proteína prion

celular no metabolismo do cobre, sendo que diversos grupos têm investigado o significado fisiológico desta associação. Assim, têm-se demonstrado que o prion possui na sua porção N-terminal regiões repetitivas ricas em histidina e glicina que são capazes de se ligar fortemente a íons cobre (PAULY & HARRYS, 1998; MARTINS & BRENTANI, 2002). Estudos com células deficientes em PrPc mostraram que estas possuem uma baixa atividade da enzima superóxido dismutase sendo proposto que a falta de PrPc pode levar à neurodegeneração pelo aumento do estresse oxidativo (PAULY & HARRYS, 1998; MARTINS & BRENTANI, 2002). Outro ponto marcante é o fato de a internalização do PrPc ser induzida pelo cobre, isso poderia indicar que esta proteína funciona como um tampão para o Cu^{2+} extracelular ou como uma proteína carreadora destes cátions para outras proteínas citosólicas (MARTINS & BRENTANI, 2002). A internalização do PrPc ocorre continuamente em cultura de células e uma grande parte desta proteína é reciclada novamente à membrana sem haver degradação (SHYNG et al., 1993). Este tráfico intracelular do PrPc é de grande interesse porque tem-se sugerido que a conversão PrPc a PrPsc ocorre em organelas ácidas intracelulares como lisossomos e endossomos (LEE et al., 2001). Sabe-se que esta internalização é mediada tanto por vesículas recobertas por clatrina quanto por caveolina (SHYNG et al., 1993; MARTINS et al., 1997), entretanto, ambos os caminhos parecem requerer uma terceira proteína (um receptor) tanto para fazer a conexão entre a âncora de GPI e clatrina, quanto para a conversão de PrPc a PrPsc (MARTINS et al., 1997).

Estudos desenvolvidos por SHYNG e seu grupo (1995), com chPrP (molécula de galinhas, homóloga ao prion de mamíferos), demonstraram que a região N-terminal dessa proteína é essencial à sua internalização, sendo demonstrado por LEE e colaboradores (2001) que a internalização do prion celular falha quando são usadas moléculas mutantes com deleções na região N-terminal, ocorrendo o acúmulo destas moléculas na membrana plasmática mesmo na presença dos íons cobre.

Pesquisas recentes demonstraram também que o peptídeo composto pelos resíduos 106 a 126 do prion celular humano reproduz, em cultura de células, todos os efeitos patológicos da proteína anormal, sendo esta uma região bem conservada entre as espécies (FORLONI, 1993). Tendo em vista esta relação entre

neurotoxicidade e internalização do PrPc, MARTINS e colaboradores (1997) especularam que a região da molécula contendo os resíduos 106-126 conteria o sítio de reconhecimento de um possível receptor capaz de participar da internalização do PrPc. Com base no conceito que estipula que peptídeos codificados por fitas complementares de DNA, reconhecem e/ou ligam-se um ao outro (teoria do reconhecimento molecular ou hidropaticidade complementar); os autores deduziram um peptídeo codificado pela fita complementar ao gene do PrPc contendo os sinais de neurotoxicidade e internalização. Este peptídeo complementar ao prion (PrR) foi então quimicamente sintetizado e usado para imunizar camundongos. A partir da utilização de técnica de imunofluorescência e microscopia confocal foi possível mostrar que o soro dos camundongos, o qual reconhece o peptídeo complementar ao PrPc, reconheceu também, em culturas de neurônios, um antígeno de 66-kDa presente na membrana celular e que apresenta 93-96% de semelhança com a molécula STI1 de camundongos. Experimentos posteriores *in vitro* mostraram que este antígeno – STI1 – liga PrPc e que, tanto o peptídeo complementar ao prion (PrR) quanto o soro que o reconhece bloqueiam *in vivo* os efeitos neurotóxicos mediados pelo prion humano (resíduos 106-126) (MARTINS et al., 1997, ZANATA et al., 2002). Estes resultados fortemente sugerem a existência de um receptor específico ao prion que é possivelmente responsável pela sua internalização e por respostas celulares mediadas pelo prion.

ZANATA e colaboradores (2002) observaram que a proteína STI1 interage com o PrPc nos resíduos 113-128, ou seja, com a mesma seqüência usada para definir o peptídeo complementar ao prion nos trabalhos de MARTINS e colaboradores (1997), de forma independente de íons cobre. Esta observação foi possível devido à construção de mutantes da proteína prion celular com deleções em torno da região do domínio neurotóxico. Com isso, foi observado que a proteína mutante, PrPc Δ 105-128, era incapaz de ligar a STI1, enquanto que o PrPc sem o domínio de ligação ao cobre (PrPc Δ 51-90) ligava STI1 similarmente ao tipo selvagem. Foi observado ainda que o domínio de ligação do STI1 (aminoácidos 230-245) ao PrPc possui propriedades idênticas ao PrR.

Paralelamente CHIARINI e colaboradores (2002) demonstraram que o peptídeo PrR é capaz de induzir respostas neuroprotetivas em camadas

neuroblásticas de explantes de retina de ratos neonatos. A neuroproteção através do peptídeo PrR é dependente da presença de PrPc endógeno na superfície das células e mediada pela ativação de uma proteína quinase dependente de cAMP. Neste trabalho também foi demonstrado que anticorpos que ligam PrPc e que induzem um aumento na concentração intracelular de cAMP também desencadeiam uma resposta neuroprotetiva dependente de PrPc. Pesquisas realizadas por ZANATA e colaboradores (2002) confirmam estes resultados, observando que tanto o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ (seqüência da proteína STI1 que contém o sítio de ligação ao PrPc) quanto a molécula STI1 inteira, desencadeiam uma eficiente resposta neuroprotetiva, reduzindo significativamente a morte celular induzida por anisomicina.

Estes resultados mostram que a interação PrPc – STI1 provavelmente possui um impacto na sensibilidade de tecidos nervosos à morte celular. Dados ainda demonstram que a associação PrPc –STI1 não exclui a interação com a laminina, indicando que PrPc pode ser parte de um complexo macromolecular composto, pelo menos, pela laminina, pelo PrPc e pelo STI1 (MARTINS et al., 2002), que transduz sinais tanto de proteção celular quanto de diferenciação (ZANATA et al., 2002).

Tendo em vista que o enfoque dado à proteína STI1 é recente, constata-se uma relativa ausência de dados acerca deste assunto. Com isso, estudos envolvendo o mapeamento tecidual desta proteína podem colaborar na elucidação da sua participação em processos fisiológicos normais e patológicos envolvendo respostas mediadas por prions. O uso de embriões de camundongos para tal avaliação de distribuição possibilita a visualização do organismo como um todo permitindo a análise de todos os tecidos em conjunto. Permitindo ainda, o levantamento de uma possível participação desta proteína no desenvolvimento normal dos tecidos onde se encontra.

2. OBJETIVO

- Determinar a distribuição da proteína STI1 (stress-inducible protein 1), um ligante da proteína prion celular, através de estudos imunohistoquímicos em embriões de camundongos com treze dias de desenvolvimento embrionário.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a fase piloto e a fase experimental.

3.1.1. Fase Piloto

A fim de avaliar a viabilidade de diferentes protocolos de imunohistoquímica para este trabalho, e de padronizar a diluição do anticorpo primário a ser utilizada, foram realizados, durante esta fase, uma série de experimentos-piloto utilizando um total de 16 embriões.

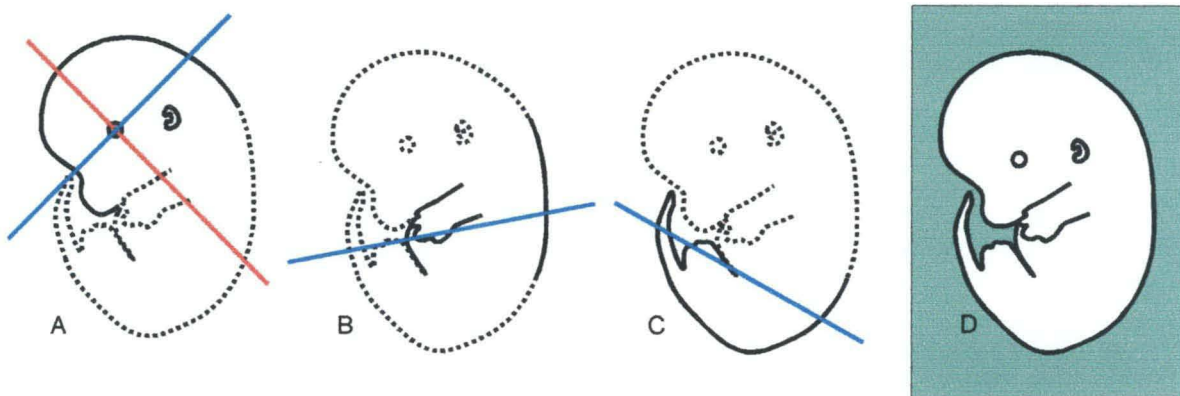
Todos os 16 embriões utilizados foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em PBS 1X e seccionados nas regiões cefálica, do tronco e caudal para posteriores cortes coronais (região cefálica) e transversais (regiões cefálica, do tronco e caudal), ou ainda, seccionados sagitalmente (embrião inteiro) (FIGURA 01). Dez destes embriões foram direcionados para o congelamento em nitrogênio líquido, cortes em criostato e incubação segundo o protocolo de imunofluorescência, sendo que 05 foram submetidos ao protocolo de inclusão em gelatina e 05 ao protocolo de inclusão em gel crioprotetor *Tissue Freezing Medium*. Os outros 06 embriões foram direcionados para cortes em micrótomo, sendo submetidos ao protocolo de inclusão em *Paraplast*.

As 05 lâminas obtidas neste último protocolo foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica para a padronização da diluição do anticorpo primário, com a utilização de anticorpo secundário acoplado com Peroxidase. As lâminas submetidas a este protocolo foram assim divididas:

- 01 lâmina: anticorpo primário com uma diluição de 1:400 em solução de BSA 0,1% em PBS 1X;
- 01 lâmina (controle): IgG pré-imune em concentração equivalente à diluição de 1:400 do anticorpo primário;

- 01 lâmina: anticorpo primário com uma diluição de 1:800 em solução de BSA 0,1% em PBS 1X;
- 01 lâmina (controle): IgG pré-imune em concentração equivalente à diluição de 1:800 do anticorpo primário;
- 01 lâmina (controle): incubada somente com solução de BSA 0,1% em PBS 1X.

FIGURA 01 – ESQUEMA DE CORTES TRANSVERSAIS, CORONAL E SAGITAL EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS (13 DIAS)



NOTA : A – Secção da região cefálica; B – Secção da região torácica; C- Secção da região sacral; D – Secção sagital. As linhas azuis representam cortes transversais de cada região. A linha vermelha representa corte coronal. O retângulo verde representa o corte sagital.

Desta padronização obteve-se a marcação mais nítida com uma diluição do anticorpo primário de 1:800, que foi a posteriormente utilizada na fase experimental, juntamente com o controle de igual concentração de IgG pré-imune. A lâmina em que foi utilizada uma diluição do anticorpo primário de 1:400 apresentou uma marcação muito forte, possuindo também intensa marcação de fundo (*background*), que se caracteriza pelo excesso de anticorpo primário.

3.1.2. Fase Experimental

Após ter sido feita a padronização dos protocolos e da diluição do anticorpo primário teve início a fase experimental.

Nesta fase os camundongos foram acasalados, sendo feita a coleta de embriões após 13 dias de desenvolvimento (FIGURA 02). Os 20 embriões coletados

ao longo desta fase foram seccionados nas regiões cefálica, do tronco e caudal para posteriores cortes coronais (região cefálica) e transversais (regiões do tronco e caudal), ou ainda, seccionados sagitalmente (embrião inteiro) (FIGURA 01). A fixação feita em paraformoldeído a 4% seguindo-se o protocolo de inclusão em *Paraplast*. Em micrótomo foram obtidos cortes (5µm) transversais da região cefálica, do tronco e sacral; cortes coronais da região cefálica e cortes sagitais do embrião inteiro. As lâminas assim obtidas foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica (anticorpo secundário conjugado com peroxidase). Foram confeccionadas lâminas permanentes, que posteriormente foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico.

FIGURA 02 – EMBRIÃO DE CAMUNDONGO AOS 13 DIAS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO



NOTA: A barra branca indica o tamanho natural do embrião

3.2. MATERIAIS E METODOLOGIA

3.2.1. Obtenção dos Embriões

Para a obtenção de embriões foram feitos acasalamentos entre camundongos da linhagem SWISS, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Anteriormente ao acasalamento, foi feita a regulação do ciclo estral das fêmeas. Para tanto, as gaiolas de machos e fêmeas foram deixadas próximas, por no mínimo 48 horas antes do acasalamento. Os acasalamentos foram realizados em períodos de 2 horas, com o uso de duas fêmeas para cada macho. As fêmeas foram então separadas dos machos, passando este

dia a ser contado como o dia zero de desenvolvimento embrionário. Determinada visualmente a gestação, os embriões foram coletados após 13 (treze) dias de desenvolvimento. As fêmeas foram sacrificadas por inalação de éter etílico, com coleta imediata do útero gravídico e respectivos embriões, os quais foram retirados de todos os seus anexos embrionários.

3.2.2. Anticorpos

Para a imunohistoquímica foram utilizadas alíquotas do anticorpo policlonal anti-STI1 produzido em coelhos, descrito por ZANATA e colaboradores (2002) e fornecidas pelo Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Como anticorpo secundário foi utilizado IgG de mula anti-coelho conjugado com Peroxidase (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA*).

3.2.3. Processamento Imunohistoquímico dos Embriões

Após a coleta os embriões foram seccionados nas regiões cefálica, do tronco e caudal para posteriores cortes coronais (região cefálica) e transversais (regiões do tronco e caudal), ou ainda, seccionados sagitalmente (embrião inteiro). A fixação deve ser feita em Paraformaldeído a 4% por 2 horas, após isso os embriões foram mantidos em álcool a 70% por 16 horas, sendo posteriormente realizada a desidratação do material em incubações sequenciais de álcoois e xilol para a emblocagem em *Paraplast*.

Os cortes (5µm) obtidos em micrótomo foram então, após desparafinização, incubados com anticorpo policlonal anti-STI1 produzido em coelhos. Como controle, algumas lâminas foram incubadas com IgG pré-imune de coelhos. A seguir as lâminas foram lavadas e incubadas com IgG de camundongo anti-coelho conjugada com Peroxidase, reveladas em solução de diaminobenzidina (DAB) (0,05%) + H₂O₂ (0,01%) em PBS 1X e contra-coradas com hematoxilina. As lâminas assim obtidas foram montadas em Permount (*Fisher Scientific, New Jersey, USA*).

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscopia ótica.

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Inclusão em *Paraplast*

1. Fixar os embriões em Paraformaldeído 4% em 1X de PBS, por duas horas;
2. Lavar o material três vezes com 1X de PBS, 10 minutos cada lavagem;
3. Transferir os embriões para álcool 70% *overnigh*;
4. Substituir o álcool 70% por álcool 90%;
5. Fazer duas trocas de 1 hora cada em álcool 90%;
6. Fazer quatro trocas de 1 hora cada em álcool 100%;
7. Lavar, 2 vezes, em xilol. 15 minutos cada lavagem;
8. Fazer, em estufa a 60°C, três trocas de 30 minutos cada, em *Paraplast* líquido;
9. Emblocar.

3.3.2. Protocolo de Incubação dos Embriões

1. Deixar as lâminas com os cortes obtidos em micrótomo (5µm) em estufa a 56°C por 2 horas;
2. Fazer duas lavagens em xilol, 30 minutos cada;
3. Lavar duas vezes, 5 minutos cada, em álcool 100%;
4. Lavar, por 5 minutos, em álcool 90%;
5. Lavar, por 5 minutos, em álcool 70%;
6. Lavar, por 5 minutos, em álcool 50%;
7. Lavar as lâminas duas vezes, com PBS 1X, por 5 minutos cada;
8. Bloquear, por 5 minutos, com peroxidase endógena: PBS 1X + H₂O₂ 0,3%;
9. Lavar com PBS 1X, duas vezes, por 5 minutos cada;
10. Bloquear inespecificidade com PBS 1X + BSA 1%, por 30 minutos, em temperatura ambiente;
11. Incubar *por 16 horas*, em câmara úmida, a 4°C, com anticorpo primário (1:800) em solução de BSA 0,1% em PBS 1X. Incubar as lâminas controle com IgG pré-imune de coelhos em mesma concentração;

12. Lavar três vezes em PBS 1X, 5 minutos cada;
13. Lavar, por 5 minutos, com triton 0,5%;
14. Bloquear em solução de PBS 1X + BSA 1%, por 15 minutos, em temperatura ambiente;
15. Incubar por 90 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente, com o anticorpo secundário acoplado com Peroxidase (1:100) em solução de PBS 1X;
16. Lavar três vezes em PBS 1X, 5 minutos cada;
17. Tratar, à temperatura ambiente, em câmara úmida e escura, com PBS 1X + DAB (0,05%) + H₂O₂ (0,01%) por 10 minutos;
18. Lavar duas vezes com PBS 1X, 5 minutos cada;
19. Lavar com água destilada por 5 minutos;
20. Corar com Hematoxilina filtrada por 20 segundos, lavar e deixar de molho em água da torneira por 10 minutos;
21. Desidratar: 3 minutos em cada álcool e 5 minutos xilol. Montar.

4. RESULTADOS

A dificuldade de obtenção de cortes satisfatórios em criostato foi um dos motivos que levaram a exclusão deste procedimento neste trabalho. Outro motivo que somou-se ao anterior, foi o fato de o laboratório possuir duas alíquotas de anticorpo secundário complexado com isotiocianato de fluorescência (FITC) que apresentaram resultados conflitantes nos protocolos de imunohistoquímica realizados nesta fase piloto.

Com base nisto optou-se pela inclusão do material em *Paraplast*, e a obtenção de cortes em micrótomo. Durante a Fase Piloto, os três primeiros embriões submetidos ao protocolo de inclusão em *Paraplast* apresentaram problemas na sua desidratação devido à necessidade de padronização do tempo de desidratação, e também, devido ao fato de os álcoois 99,5% comercializados apresentarem-se hidratados. Após a padronização do tempo de desidratação do material e da correção do álcool 99,5% com o uso de sulfato de cobre, outros 03 embriões foram corretamente incluídos em *Paraplast*, sendo obtidos cortes em micrótomo de 5µm para a padronização da diluição do anticorpo primário.

Com padronização correta da diluição do anticorpo primário (1:800) obteve-se, nos experimentos de imunohistoquímica realizados, uma ampla porém precisa e nítida marcação referente à distribuição da proteína STI1 em embriões de camundongos com 13 dias de desenvolvimento notando-se esta marcação em tecidos como mesênquima (tecido conjuntivo embrionário), cartilagens, epitélios de revestimento e tecido neural.

4.1. CORTES TRANSVERSAIS DAS REGIÕES TORÁCICA E SACRAL

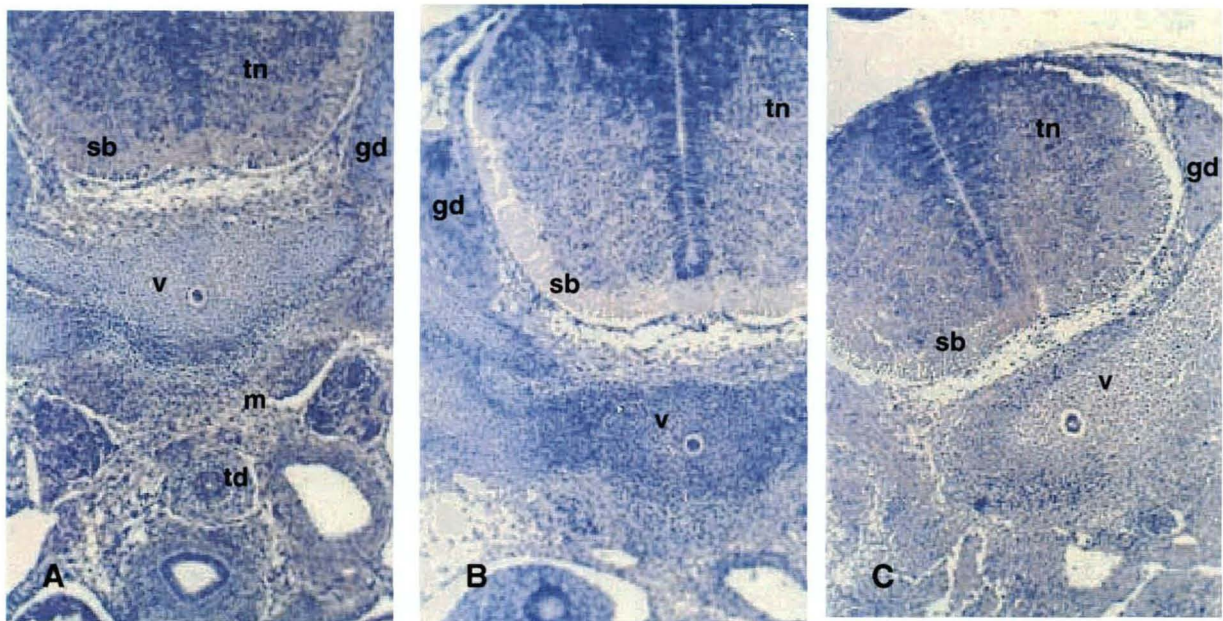
Nos cortes transversais das regiões torácica e sacral pôde-se observar uma marcação nítida ao longo de todo o tubo neural (FIGURA 03). Esta marcação se mostrou bem menos pronunciada na região mais próxima ao lúmen do tubo neural, a região proliferativa ou neuroepitélio germinativo (zona ventricular). Nota-se ainda que a marcação se intensifica da zona intermediária para a zona marginal do tubo neural, onde encontra-se a substância branca, ou seja, neurônios mielinizados. Os gânglios de raiz dorsal são difusamente imunopositivos.

Observou-se ainda a presença marcante da proteína STI1 em nervos periféricos (FIGURA 04 A e B).

Foi ainda observada marcação no epitélio prismático do tubo digestório. Esta marcação não se manteve constante ao longo do tubo digestório, ocorrendo locais de marcação mais e menos intensa (FIGURA 04 C).

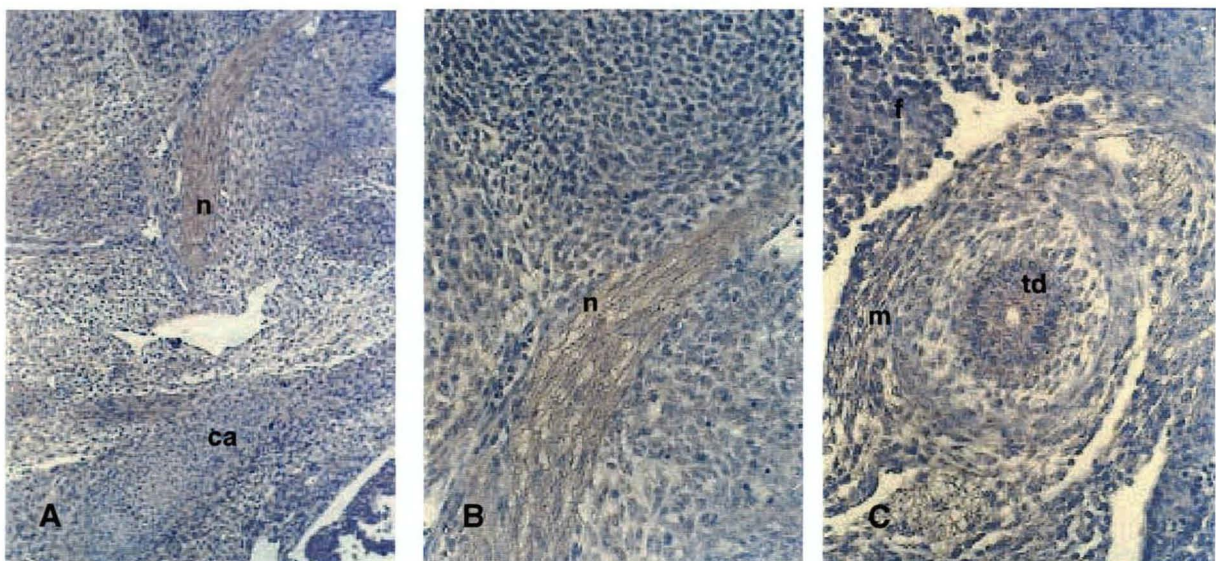
Nos cortes transversais de tronco e da região sacral observou-se a presença de condrócitos STI1 positivos na vértebra em formação, assim como nos moldes cartilagosos de ossos dos membros. Esta marcação se mostrou mais pronunciada nos condrócitos mais maduros, localizados no interior do corpo da vértebra. Não foi observada nenhuma marcação na matriz cartilaginosa, bem como na região do pericôndrio (FIGURAS 03 E 04). O mesênquima de todos os cortes se mostrou, de uma maneira difusa, STI1 positivo.

FIGURA 03 – CORTES TRANSVERSAIS DO TUBO NEURAL



NOTA: Cortes de embriões de camundongos (13 dias) submetidos à imunohistoquímica para a detecção da proteína STI-1. A – corte transversal da região torácica (100X). B – corte transversal da região torácica (controle) (100X). C – corte transversal da região sacral (100X). Observar a presença de imunomarcação na região intermediária do tubo neural, assim como na substância branca. Mesênquima e epitélio do tubo digestório imunopositivos, enquanto gânglios da raiz dorsal apresentam marcação difusa. Não é observada marcação no corte controle. **gd** – gânglio da raiz dorsal; **m** – mesênquima; **sb** – substância branca; **td** – tubo digestório; **tn** – tubo neural; **v** – vértebra.

FIGURA 04 – CORTES TRANSVERSAIS DA REGIÃO TORÁCICA



NOTA: Imunomarcação da proteína STI-1 em cortes transversais da região torácica. A – corte próximo ao membro anterior (100X). B – ampliação do nervo mostrado em A (250X). C – corte do tubo digestório (250X). Nas Figuras A e B nota-se intensa marcação no nervo periférico. Em C observar a presença de células imunopositivas no epitélio de revestimento do tubo digestório. **ca** – cartilagem; **m** – mesênquima; **n** – nervo periférico; **td** – tubo digestório.

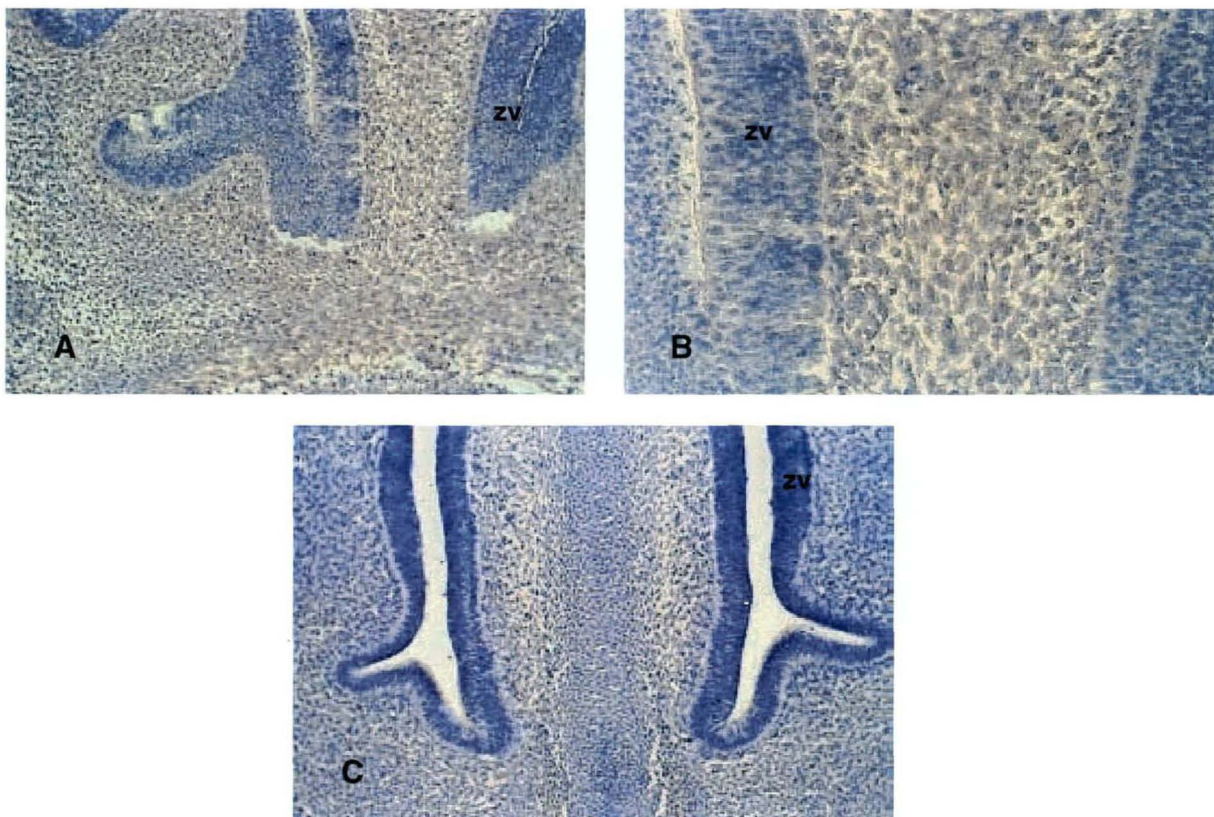
4.2. CORTES TRANSVERSAIS E CORONAIS DA REGIÃO CEFÁLICA

Nos cortes da região cefálica pôde-se observar células STI1 positivas em todo o mesênquima de preenchimento. Porém, a marcação mais intensa foi encontrada na zona cortical do tubo neural, estando o neuro epitélio proliferativo (zona ventricular), como o observado ao longo do tubo neural, livre de marcação (FIGURAS 5 e 7).

No olho (corte transversal) nota-se que as células da córnea são STI1 positivas. O epitélio cúbico do cristalino não apresentou marcação, enquanto que as fibras do cristalino e o humor vítreo apresentaram uma marcação difusa. Em relação à retina, a sua porção nervosa não mostrou-se marcada, enquanto que a camada pigmentada apresentou uma fraca marcação. O nervo óptico em formação se mostrou STI1 negativo (FIGURA 06).

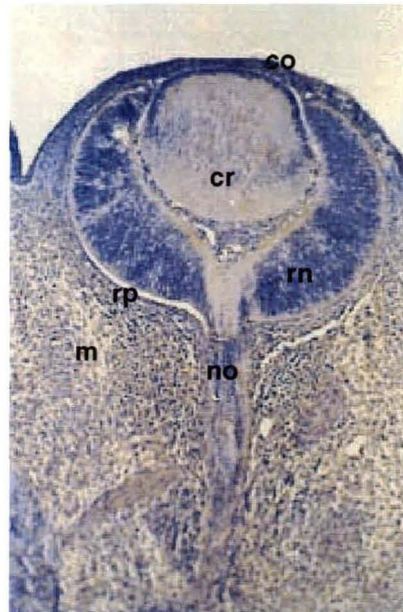
Nos cortes coronais da região cefálica observou-se marcação na mucosa da cavidade bucal e também no interior da língua.

FIGURA 05 – CORTES TRANSVERSAIS DO DIENCÉFALO



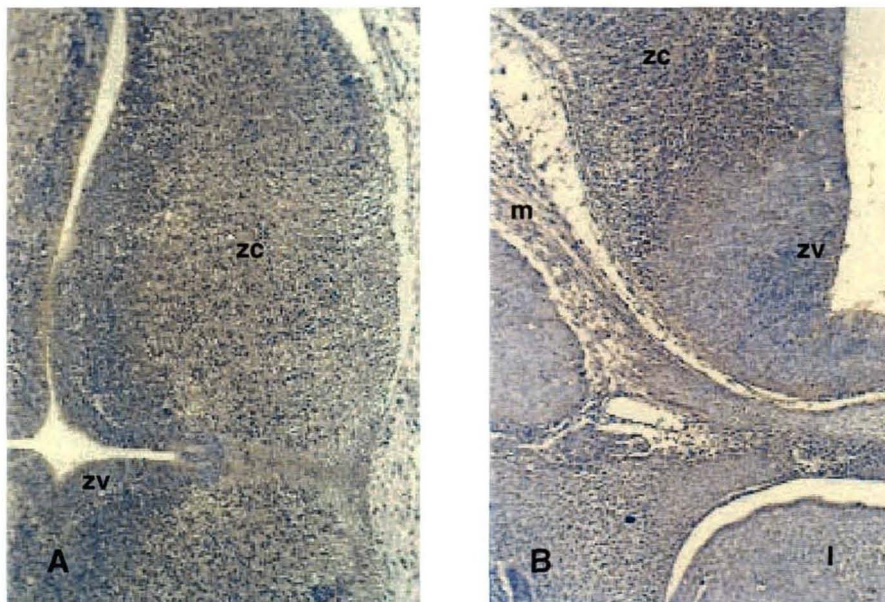
NOTA: Cortes transversais do diencéfalo submetidos à imunohistoquímica para a detecção da proteína STI-1. A – imunomarcação do diencéfalo (100X). B – ampliação da região mostrada em A (250X). C – corte controle (100X). **zv** – zona ventricular do tubo neural

FIGURA 06 – CORTE TRANSVERSAL DO OLHO



NOTA: Imunomarcagem de um corte transversal do olho. Observar a marcação difusa do cristalino, córnea e porção pigmentada da retina. Retina (porção nervosa) e nervo óptico em formação STI-1 negativos. Mesênquima imunopositivo (100X). **co** – córnea; **cr** – cristalino; **m** – mesênquima; **no** – nervo óptico; **rn** – retina (porção nervosa); **rp** – retina (porção pigmentada).

FIGURA 07 – CORTES CORONAIS DA REGIÃO CEFÁLICA

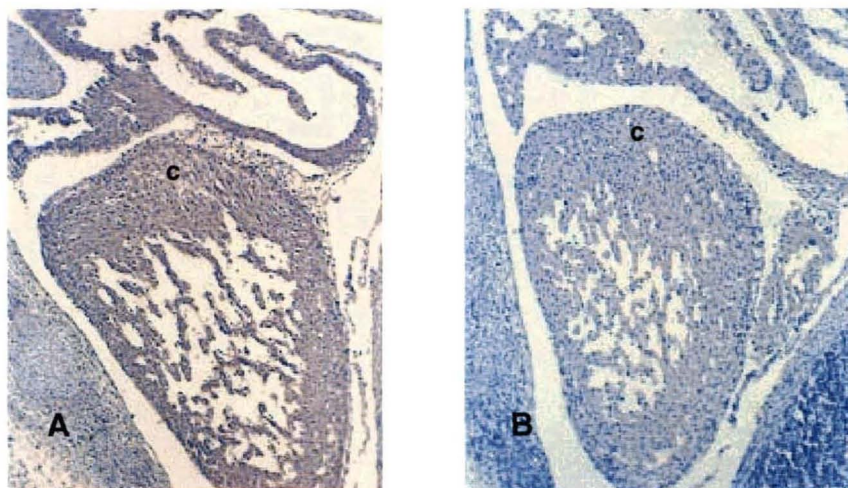


NOTA: Imunomarcagem de cortes coronais da região cefálica. A – corte do telencéfalo (100X). B – corte coronal na região da cavidade bucal (100X). Nota-se uma intensa marcação na zona cortical do tubo neural. Mesênquima imunopositivo. **l** – língua; **m** – mesênquima; **zc** – zona cortical do tubo neural; **zv** – zona ventricular do tubo neural.

4.3. CORTES SAGITAIS

Nos cortes sagitais dos embriões foi possível observar o quão ampla é a distribuição da proteína STI1. Aos 13 dias de desenvolvimento pode-se observar uma forte marcação em todo o tecido muscular cardíaco. As lâminas controle apresentaram uma fraca marcação de fundo no coração, que acredita-se ter como causa a presença de peroxidase endógena neste órgão. Devido à intensidade desta marcação ser muito fraca, quando comparada com a obtida nas lâminas não controle, descartou-se a hipótese de um falso positivo neste tecido (FIGURA 08).

FIGURA 08 – CORTES SAGITAIS DO CORAÇÃO

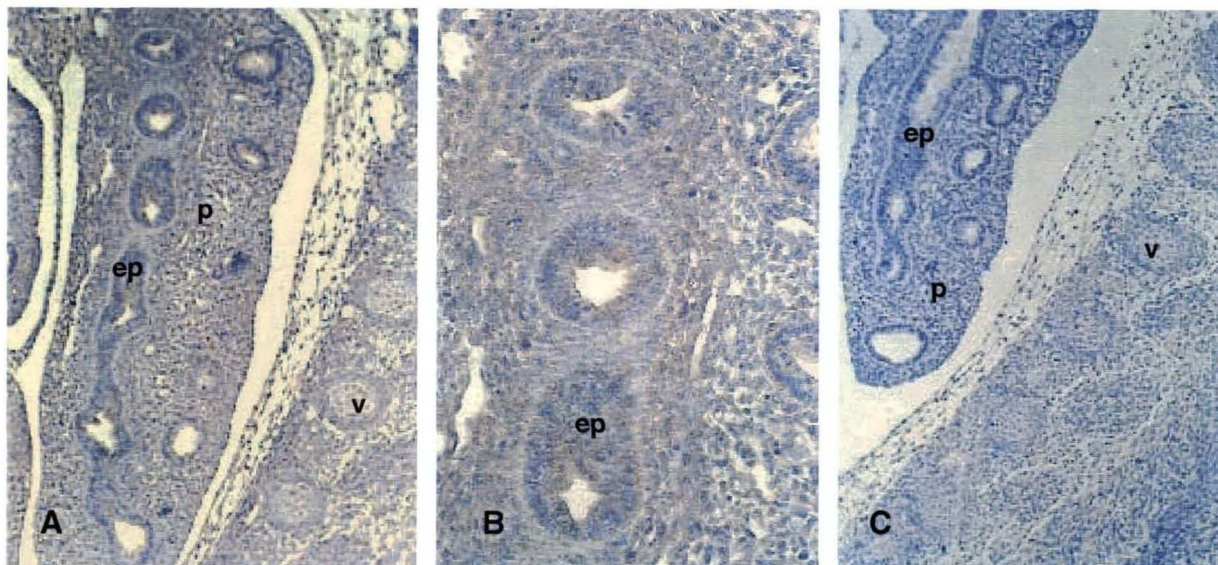


NOTA: Cortes sagitais do coração submetidos à imunomarcação para a detecção da proteína STI-1. A – corte do coração (100X). B – corte controle (100X). Observar a intensa marcação no tecido muscular cardíaco. **c** – coração.

No pulmão em formação constatou-se a presença de células STI1 positivas no epitélio respiratório. Esta marcação foi observada apenas em algumas células mais próximas à luz dos bronquíolos (FIGURA 09).

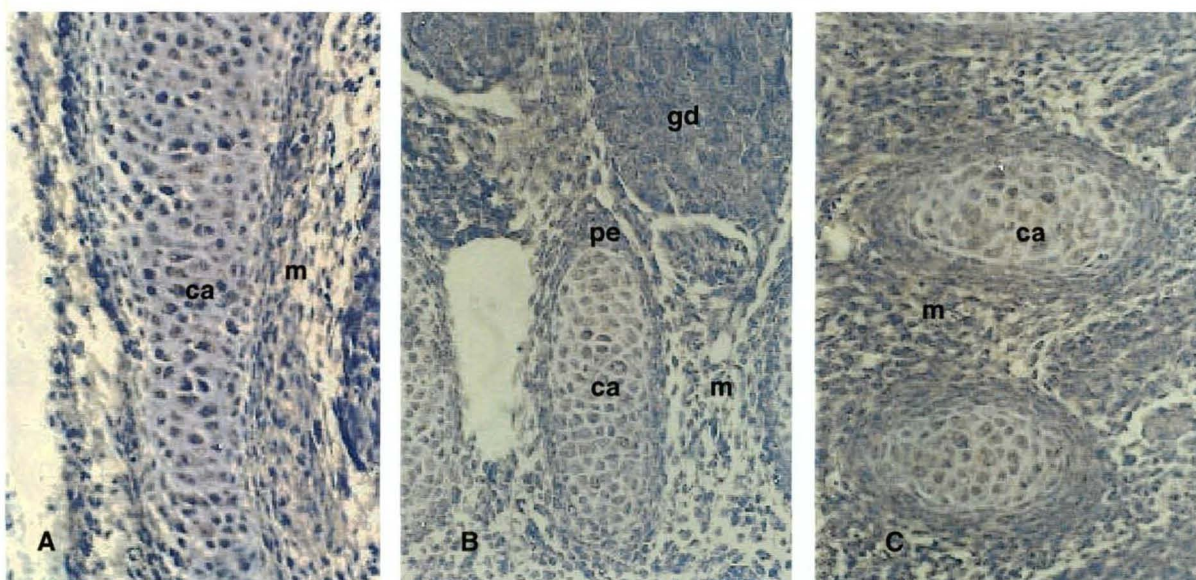
Outra marcação encontrada nestes cortes, foi a de condrócitos em moldes cartilaginosos de ossos em formação, como as vértebras, a mandíbula e a maxila, e os ossos dos membros. Esta marcação segue o mesmo padrão descrito anteriormente, apresentando, condrócitos maduros marcados, matriz e pericôndio não marcados (FIGURA 10).

FIGURA 09 – CORTES SAGITAIS DE PULMÃO



NOTA: Cortes sagitais de pulmão submetidos à detecção da proteína STI-1 por imunohistoquímica. A – corte sagital de pulmão (100X). B – ampliação da região mostrada em A (250X). C – corte sagital de pulmão (controle) (100X). Observar a presença de células imunopositivas no epitélio pulmonar e mesênquima. Cartilagens das vértebras com condrócitos imunopositivos. **ep** – epitélio pulmonar; **p** – pulmão; **v** – vértebra.

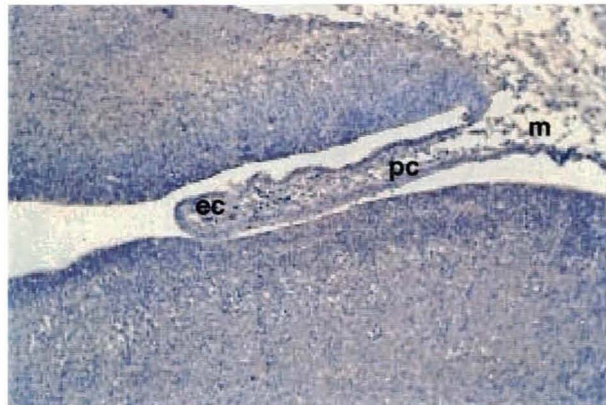
FIGURA 10 – CORTES DE MOLDES DE CARTILAGEM



NOTA: Cortes sagitais de moldes de cartilagem imunomarcados. A – molde da mandíbula (100X). B – molde de vértebra (100X). C – molde de vértebra (100X). Observar a presença de condrócitos imunomarcados na região central dos moldes. Pericôndrio e matriz cartilaginosa imunonegativo. Mesênquima imunopositivo. **ca** – cartilagem; **gd** – gânglio da raiz dorsal; **m** – mesênquima; **pe** – pericôndrio.

O padrão de marcação encontrado na região cefálica destes cortes segue o descrito para os cortes transversais e coronais da mesma região. Um dos cortes obtidos incidiu sobre o quarto ventrículo, sendo possível observar o plexo coróide. Neste tecido não se observou marcação no tecido epitelial cúbico entretanto, o mesênquima apresenta-se positivamente marcado (FIGURA 11).

FIGURA 11 – CORTE SAGITAL DO PLEXO CORÓIDE

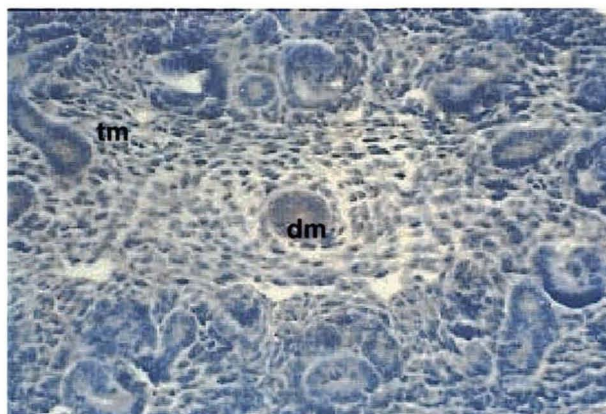


NOTA: Corte sagital demonstrando presença de células positivas para STI-1 no mesênquima do plexo coróide (100X). **ec** – epitélio cúbico; **m** – mesênquima; **pc** – plexo coróide.

Foi detectada marcação no ducto e nos túbulos mesonéfricos, sendo que a marcação do ducto mesonéfrico apresentou-se constantemente mais intensa (FIGURA 12).

O fígado apresentou-se fracamente positivo à técnica utilizada porém, esta marcação mostrou-se bastante homogênea.

FIGURA 12 – CORTE SAGITAL DE DUCTO E TÚBULOS MESONÉFRICOS



NOTA: Detecção por imunohistoquímica de STI-1 em corte sagital de ducto e túbulos mesonéfricos (100X). **dm** – ducto mesonéfrico; **tm** – túbulos mesonéfricos.

5. DISCUSSÃO

A detecção da proteína STI1, nos testes de imunohistoquímica realizados, em condrócitos maduros, axônios mielinizados, células musculares cardíacas, assim como em células epiteliais de revestimento em bronquíolos e tubo digestório, entre outras; revela a tendência de distribuição desta proteína em células diferenciadas. Essa idéia é corroborada pelo fato de não terem sido encontradas células STI1 positivas no pericôndrio, na zona ventricular (neuroepitélio proliferativo) de todo o tubo neural e também no nervo óptico em formação. Tendo em vista que a diferenciação celular é caracterizada pelo processo onde a célula sofre uma série de alterações no seu padrão de expressão gênica, tornando-se um tipo celular verdadeiramente especializado (ALBERTS et al., 1997), um possível papel para o STI1, neste contexto, seria a atuação, direta ou indireta, na regulação da expressão gênica, como propõe HONORÉ e seus colaboradores (1992). Faz-se necessário, entretanto, o mapeamento desta proteína em outros estágios de desenvolvimento, e também em animais adultos, para que se possa, além de reconhecer este possível padrão de distribuição, elucidar de maneira mais concreta possíveis papéis desta proteína no desenvolvimento embrionário.

Outro resultado interessante encontrado, e não menos relacionado, diz respeito a ampla distribuição da proteína, que foi encontrada em diversos tipos teciduais, incluindo epitélios, cartilagens e tecidos neurais. Isso poderia estar ligado ao fato de um grande número de proteínas de choque térmico estarem relacionadas à atividade de chaperonina molecular, mediando a correta montagem e localização de polipeptídeos intracelulares e secretados. Para KRONE (2003) a importância das proteínas de choque térmico é retratada no fato de um grande número de genes de choque térmico serem expressos em altos níveis durante o período normal de crescimento celular, o que corrobora os resultados encontrados no presente trabalho. Ainda segundo KRONE (2003) estas e outras características das proteínas de choque térmico fazem com que estas sejam atualmente consideradas como proteínas de manutenção das atividades celulares (também chamadas housekeeping) que são expressas em altos níveis em todos os tipos celulares, uma vez que são necessárias aos mesmos, em um organismo, independentemente da

sua função especializada (ALBERTS et al., 1997). Porém, uma série de trabalhos realizados com estas proteínas, em diferentes animais, tem claramente mostrado que as proteínas de choque térmico apresentam outras funções além das consideradas para proteínas *housekeeping*.

Uma destas novas funções atribuídas às proteínas de choque térmico, é a proposta por MARTINS e colaboradores (1997) ao reconhecer que a proteína STI1 interage com o prion celular, e que uma pequena quantidade do STI1 estaria presente na superfície celular. Esta interação ocorre segundo ZANATA e colaboradores (2002) nos resíduos 113-128 do PrPc, uma região muito conservada desta molécula, e proposta como a responsável pela neurotoxicidade e internalização do PrPc.

Seguindo a idéia de interação entre PrPc e STI1 e, tendo como base os trabalhos de MANSON e colaboradores (1992) que, através a hibridização *in situ* buscaram os locais de expressão do PrPc em embriões de camundongo, e de FORD e colaboradores (2002) que, trabalhando com camundongos adultos, realizaram testes de hibridização *in situ* e imunohistoquímica para a detecção do PrPc; pôde-se observar que, apesar de a distribuição do PrPc ser, tanto em embriões, quanto em adultos, menos ampla que a encontrada neste trabalho para o STI1, houveram vários sítios de co-localização destas proteínas. O tecido muscular foi apontado por FORD e colaboradores (2002) como um importante sítio de expressão do PrPc, sendo que no presente trabalho pôde-se observar células musculares imunopositivas em todo o tecido muscular cardíaco, assim como na musculatura estriada da língua. Houve também co-localização no epitélio respiratório e no pâncreas. Porém, a co-localização mais marcante ocorre no tecido neural que, tanto no Sistema Nervoso Central, quanto no periférico, apresentou altos níveis de expressão de PrPc e STI1, o que corrobora a idéia de uma possível participação do STI1 na internalização e neurotoxicidade do PrPc.

Segundo ANDREOLETTI e colaboradores (2000) experimentos fortemente sugerem que a forma infecciosa do prion normalmente é transmitida via a entrada deste agente através do epitélio do trato gastro-intestinal. O fato de este trabalho ter demonstrado a presença de células STI1-positivas ao longo do tubo digestório soma à hipótese de participação do STI1 como um receptor ao prion.

MA e LINDQUIST (2001) observaram que uma forma mutante do PrPc, associada a encefalopatia espongiforme, acumula no citoplasma e co-localiza com Hsp70, que é encontrado em um complexo com STI1 e Hsp90 (LÄSSLE et al. 1997). Levando em consideração esta co-localização, o fato de que a exposição do Prpc ao ambiente citoplasmático favorece a conformação PrP^{SC} (MA; LINDQUIST, 2001), a interação STI1/ PrPc no sítio de neurotoxicidade e internalização deste, e a atividade chaperonina do complexo STI1–Hsp70–Hsp90, cria-se ainda um panorama de possível participação do STI1 no processo de conversão do PrPc em PrPsc.

Contudo, ainda existe a pergunta de como, e onde, ocorre esta interação STI1/ PrPc, uma vez que o STI1, especulado como um provável receptor do PrPc para a sua internalização em vesículas recobertas por clatrina, não apresenta nem um domínio transmembrana, nem um sinal de transporte para a membrana. Uma possível resposta para esta pergunta pode estar na existência de sítios de ligação do STI1 ao Hsp70. Trabalhos têm demonstrado (GAO et al. 1991; DE LUCA-FLAHERTY, et al., 1990) que a proteína Hsp70 atua, de uma forma ATP-dependente, na remoção da cobertura de clatrina de vesículas recobertas por clatrina. Outros trabalhos (Schumacher et al., 1994) mostram ainda que as necessidades de K⁺, Mg²⁺ e ATP para a boa atuação do complexo STI1–Hsp70–Hsp90 como chaperonina são as mesmas requeridas no processo de desmontagem da clatrina mediado por Hsp70. Com isso cria-se a hipótese de que a proteína STI1 presente na superfície celular, atuando como um receptor ao prion celular, poderia concentrar esta molécula em vesículas recobertas por clatrina (devido ao sítio de ligação ao Hsp70). Uma posterior exposição do conteúdo da vesícula ao ambiente citoplasmático poderia, então, levar à formação do complexo STI1–Hsp70–Hsp90 que, possuindo uma ação de chaperonina, atuaria na conversão do Prpc em Prpsc.

A ampla distribuição da proteína STI1 demonstrada neste trabalho, somada ao enfoque recente dado a tal proteína, e a grande gama de possíveis participações do STI1, tanto em atividades celulares normais, quanto patológicas mediadas por prions, torna necessário um maior número de pesquisas neste contexto, que possam elucidar a importância desta proteína no desenvolvimento embrionário, assim como na fisiologia do organismo adulto.

6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, conclui-se que:

1. A imunohistoquímica, com inclusão do material em *Paraplast*, é uma boa técnica para a detecção da proteína STI1 em embriões de camundongos;
2. O uso de concentrações altas do anticorpo primário em técnicas de imunohistoquímica pode levar a marcações conflitantes e excesso de marcação de fundo (*background*) o que dificulta a análise dos resultados;
3. A proteína STI1 apresenta uma ampla distribuição em embriões de camundongos com 13 dias de desenvolvimento, estando assim dentro do esperado para uma proteína de choque térmico;
4. A localização da proteína STI1 encontrada neste trabalho reflete uma distribuição dependente de diferenciação celular, podendo, com o mapeamento desta proteína em outros estágios de desenvolvimento, haver a caracterização do STI1 como um marcador de diferenciação celular;
5. A proteína STI1 apresenta co-localização com o prion celular em tecidos como o tecido muscular cardíaco, tubo digestório e, principalmente o tecido neural, tanto no Sistema Nervoso Central, quanto no periférico, corroborando com a idéia de interação entre estas duas moléculas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ª Edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

ANDREOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; VAN KEULEN, L.; SCHELCHER, F.; ELSEN, J.M.; LANTIER, F. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 3115-3126, 2000.

BLATCH, G.L.; LÄSSLE, M.; ZETTER, B.R.; KUNDRA, V.; Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**, v. 194, p. 277-282, 1997.

BRANDNER, S.; RAEBER, A.; SAILER, A.; BLATTNER, T.; FISCHER, M.; WEISSMANN, C.; AGUZZI, A. Normal host prion protein (PrP^c) is required for scrapie spread within the central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 13148-13151, 1996.

BÜELER, H.R.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73, p. 1339-1347, 1993.

CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.O.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LIDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 21, n. 13, p. 1-10, 2002.

DE LUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D.B.; PARHAM, P.; HIL, B.L. Uncoating protein (hsc 70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain Lca to stimulate ATP hydrolysis. **Cell**, v. 62, p. 875-887, 1990.

FORD, M.J.; BURTON, L.J.; MORRIS, R.J.; HALL, S.M. Selective expression of prion protein in peripheral tissues. **Neuroscience**, v. 113, n. 01, p. 177-192, 2002.

FORLONI, G.; ANGERETTI, N.; CHIESA, R.; MONZANI, E.; SALMONA, M.; BUGIANI, O.; TAGLIAVINI, F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. **Nature**, v. 362, p. 543-546, 1993.

GAO, B.; BIOSCA, J.; CRAIG, E.A.; GREENE, L.E.; EISENBERG, E. Uncoating of coated vesicles by yeast hsp70 proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 19565-19571, 1991.

GILBERT, S. **Developmental biology**. 6ª Edição. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. 749p.

GILCH, S.; SCHÄTZL, HM. Promising developments bringing prion diseases closer to therapy and prophylaxis. **Trends in Molecular Medicine**, 2003. No prelo.

GLATZEL, M.; AGUZZI, A. Peripheral pathogenesis of prion diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 613-619, 2000.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; FORLENZA, O.V.; CABRAL, A.L.B.; VEIGA, S.S.; JULIANO, M.A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Mol. Brain Res.**, v. 76, p. 85-92, 2000.

HONORÉ, B.; LEFFERS, H.; MADSEN, P.; RASMUSSEN, H.H.; VANDERKERCKHOVE, J.; CELIS, J.E. Molecular cloning and expression of a transmembrane-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **Journal Biol. Chem.**, v. 267, p. 8485-8491, 1992.

KRONE, P.H. Heat shock proteins in development, aging and evolution. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.14, p. 249, 2003.

LÄSSLE, M.; BLATCH, G.L.; KUNDRA, V.; TAKATORI, T.; ZETTER, B.R. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **Journal Biol. Chem.**, v. 272, p. 1876-1884, 1997.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, p. 1-10, 2001.

MA, J.; LINDQUIST, S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 14955-14960, 2001.

MANSON, J.; WEST, J.D.; THOMSON, V.; McBRIDE, P.; KAUFMAN, M.H.; HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development**, v. 115, p. 117-122, 1992.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; MOURA, V.; BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1376-1382, 1997.

MARTINS V.R.; BRENTANI, R.R. The biology of the cellular prion protein. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 353-355, 2002.

NICOLET, C.M.; CRAIG, E.A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Sccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p. 3638-3646, 1989.

PAULY, P.C.; HARRIS, D.A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33107-33110, 1998.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.**, v. 95, p. 13363-13383, 1998.

SCHUMACHER, R.J.; HURST, R.; SULLIVAN, W.P.; McMAHON, N.J.; TOFT, D.O.; MATTS, R. ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9493-9499, 1994.

SHYNG, S.L.; HUBER M.T.; HARRIS D.A. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15922-159228, 1993.

SHYNG, S.L.; MOULDER, K.L.; LESKO, A.; HARRIS D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 14793-14800, 1995.

SMITH, D.F.; SULLIVAN, W.P.; MARION, T.N.; ZAITSU, K.; MADDEN, B.; McCORMICK, D.J.; TOFT, D.O. Identification of a 60kDa stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp 70. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, p. 869-876, 1993.

VAN DER SPUIY, J.; KANA, B.D.; DIRR, H.W.; BLATCH, G.L. Heat shock protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. **Biochem. J.**, v. 345, p.645-651, 2000.

VAN DER SPUIY, J.; CHEETHAM, M.E.; DIRR, H.W.; BLATCH, G.L. The chaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 462-469, 2001.

WEISSMANN, C. et al. 2001. Prions and the lymphoreticular system. **Phylos. Trans. R. Soc. Lond. S. Biol. Sci**, v. 356, p. 177-184, 2001.

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJI, G.N.M.; CHIARINI, L.B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A.R.O.; CABRAL, A.L.B.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 21, n. 13, p. 1-10, 2002.